

六味地黄丸对照提取液的实验研究

郝延军¹, 赵晓笠², 桑育黎^{3*}, 陈 婧¹

1. 辽宁省食品药品检验所, 辽宁 沈阳 110023

2. 辽宁省生物医学工程研究院有限公司, 辽宁 沈阳 110026

3. 辽宁大学药学院, 辽宁 沈阳 110036

摘 要: 目的 以六味地黄丸为研究对象, 探索采用中成药对照提取液对中成药进行定量测定的质量控制新方法。方法 制备六味地黄丸对照提取液, 确定 HPLC 色谱条件, 对六味地黄丸提取物中 5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、芍药苷和丹皮酚的量进行标定; 并对该提取物进行 3 个月常温稳定性试验。结果 该色谱条件对 5 种成分的分离良好; 稳定性试验结果显示 5 种成分峰面积的 RSD 均小于 1.5%。结论 采用中成药对照提取液对六味地黄丸进行质量控制方法可行; 该方法可大大降低质量控制成本, 更全面控制中成药的质量, 为研究建立新的中成药质量控制方法提供实验依据。

关键词: 中成药对照提取液; 六味地黄丸; 马钱苷; 莫诺苷; 5-羟甲基糠醛; 芍药苷; 丹皮酚

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)02-0180-03

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.02.012

Study on reference extract solution of Liuwei Dihuang Pills

HAO Yan-jun¹, ZHAO Xiao-li², SANG Yu-li³, CHEN Jing¹

1. Liaoning Institute for Food and Drug Control, Shenyang 110023, China

2. Liaoning Biology and Medicine Engineering Academy Co., Ltd., Shenyang 110026, China

3. Pharmaceutical College, Liaoning University, Shenyang 110036, China

Key words: reference extract solution of Chinese patent medicine; Liuwei Dihuang Pills; loganin; morroniside; 5-(hydroxymethyl) furfural; paeoniflorin; paeonol

目前中药质量控制采用的最主要方法是以化学对照品为指标进行定性及定量控制^[1]。这些方法在控制中药质量的过程中发挥了重要作用。但在实际检验实践中, 这种方法的局限性已经愈发显现^[2-4]。主要体现在单一成分很难全面评价中药的质量, 过高的对照品价格及复杂的检验操作过程, 限制了该方法的进一步应用。本实验以六味地黄丸(LDP)为研究对象, 探索一种以六味地黄丸对照提取液为对照物质来对六味地黄丸进行质量控制的方法, 为建立一种新的中药质控方法提供实验依据。

1 仪器与试药

Agilent 1200 高效液相色谱仪; HU10260B 型超声清洗机(天津市恒奥科技发展有限公司); R200D 电子分析天平(瑞士 Sartorius)。

马钱苷(批号 111640-200604)、5-羟甲基糠醛(批号 111626-201007)、芍药苷(批号 110736-201035)、丹皮酚(批号 110708-200506)对照品均购自中国食品药品检定研究院; 莫诺苷(批号 101027, 质量分数 98%)购自上海融禾医药科技有限公司; 六味地黄丸(北京同仁堂科技发展股份有限公司制药厂, 批号 9012942); 乙腈(色谱纯, 美国 Tedia 公司), 甲醇(色谱纯, 天津市康科德科技有限公司)。

2 方法与结果

2.1 六味地黄丸对照提取液的制备

取六味地黄丸 15 g, 置具塞锥形瓶中, 加甲醇 200 mL, 超声提取 25 min, 滤过, 滤液经中性氧化铝柱(100~200 目, 10 g, 内径 1 cm)分离, 用 100 mL 甲醇洗脱, 收集洗脱液, 蒸至约 50 mL, 转移至

收稿日期: 2012-04-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30973866)

作者简介: 郝延军, 中药学博士, 副主任药师, 研究方向为中药质量控制。Tel: (024)25425645 E-mail: haoyanjun@sina.com

*通信作者 桑育黎 E-mail: ylsang1973@163.com

网络出版时间: 2012-12-18 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121218.1012.001.html>

100 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,用 0.45 μm 微孔滤膜滤过至安瓿中,充氮气,密封后作为六味地黄丸对照提取液。

2.2 色谱条件

色谱柱为 Capcellpak ODS 柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈 (A) -0.05%磷酸水溶

液 (B), 梯度洗脱: 0~30 min, 95%~86% B; 30~50 min, 86%~30% B; 柱温 35 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量 1 mL/min; 检测波长 237 nm; 进样量 10 μL 。检测波长的确定是在 DAD 检测下, 兼顾 5 种化合物的紫外吸收而确定。在上述色谱条件下, 对照品和供试品溶液色谱图见图 1。

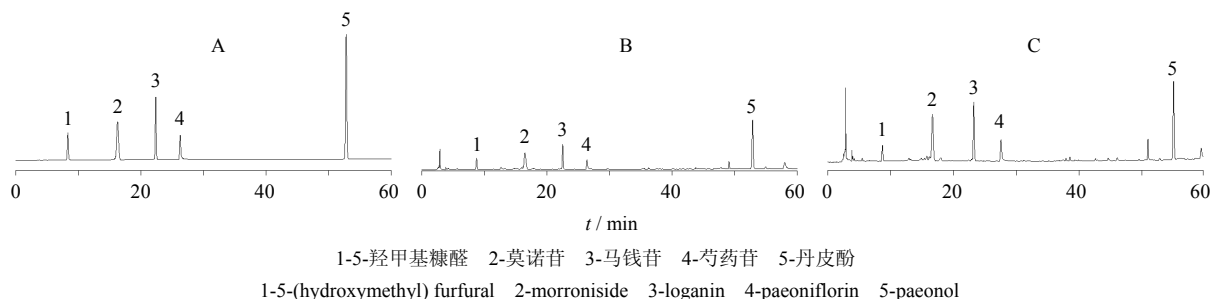


图1 混合对照品溶液 (A)、六味地黄丸对照提取液 (B) 和六味地黄丸供试品溶液 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of mixed reference solution (A), LDP reference extract solution (B), and LDP sample solution (C)

2.3 对照品溶液的制备

取 5-羟甲基糠醛、莫诺昔、马钱苷、芍药苷、丹皮酚对照品适量, 精密称定, 加甲醇使溶解, 配制成 5-羟甲基糠醛、莫诺昔、马钱苷、芍药苷、丹皮酚质量分数分别为 92.00、45.10、49.45、37.90、40.65 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.4 线性关系考察

精密吸取混合对照品溶液 2、5、10、15、20 μL 进样, 以对照品进样量为横坐标 (X), 色谱峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归, 得回归方程: 5-羟甲基糠醛 $Y=967.15X+2.02$, $r=0.9999$, 5-羟甲基糠醛进样量在 0.184~1.840 μg 与峰面积的线性关系良好; 莫诺昔 $Y=143.78X+10.72$, $r=0.9997$, 莫诺昔进样量在 90.2~902.0 ng 与峰面积的线性关系良好; 马钱苷 $Y=1552.78X+23.29$, $r=0.9995$, 马钱苷进样量在 98.9~989.0 ng 与峰面积的线性关系良好; 芍药苷 $Y=1154.52X-3.42$, $r=0.9995$, 芍药苷进样量在 75.8~758.0 ng 与峰面积的线性关系良好; 丹皮酚 $Y=90.183X+25.265$, $r=0.9995$, 丹皮酚进样量在 81.3~813.0 ng 与峰面积的线性关系良好。

2.5 精密度试验

精密吸取六味地黄丸对照提取液 10 μL , 按“2.2”项下方法测定, 连续进样 6 次, 测得 5-羟甲基糠醛峰面积的 RSD 为 1.1%, 莫诺昔峰面积的 RSD 为 1.1%, 马钱苷峰面积的 RSD 为 0.9%, 芍药苷峰面积的 RSD 为 0.7%, 丹皮酚峰面积的 RSD 为 0.9%。

结果表明仪器精密度良好。

2.6 六味地黄丸对照提取液稳定性试验

精密吸取六味地黄丸对照提取液 10 μL , 按“2.2”项下方法测定, 分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样, 测得 5-羟甲基糠醛峰面积的 RSD 为 0.6%, 莫诺昔峰面积的 RSD 为 1.0%, 马钱苷峰面积的 RSD 为 0.8%, 芍药苷峰面积的 RSD 为 1.0%, 丹皮酚峰面积的 RSD 为 0.9%。结果表明六味地黄丸对照提取液在 24 h 内测定, 稳定性良好。

2.7 六味地黄丸对照提取液定量标定

取六味地黄丸对照提取液, 按“2.2”项下方法测定, 对提取液中的 5-羟甲基糠醛、莫诺昔、马钱苷、芍药苷和丹皮酚的量进行标定, 并进行 3 个月的常温稳定性试验研究。结果见表 1。

以上实验结果显示, 该方法分离度良好, 5 种

表1 六味地黄丸对照提取液的定量标定及常温稳定性试验 ($n=6$)

Table 1 Quantitative calibration and stability test at room temperature of reference extract solution of LDP ($n=6$)

对照	质量分数 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
提取液	5-羟甲基糠醛	莫诺昔	马钱苷	芍药苷	丹皮酚
0 个月	33.41	61.11	39.03	25.42	80.53
1 个月	33.43	60.02	39.43	25.19	80.65
2 个月	33.11	61.33	38.78	25.37	80.14
3 个月	33.13	61.09	39.21	25.01	80.32
RSD / %	0.52	0.96	0.70	0.74	0.91

成分的稳定性在常温条件下3个月的质量浓度值的RSD均小于1.0%。在甲醇溶液中,氮气密封的条件下,5种成分的稳定性良好。说明以该对照提取物对六味地黄丸进行质量控制是基本可行的。

2.8 六味地黄丸供试品溶液的制备

精密称取六味地黄丸1g,置具塞锥形瓶中,加甲醇30mL超声提取25min,滤过,滤液蒸至近干,转移至10mL量瓶中,加甲醇至刻度得供试品溶液。

2.9 重复性试验

精密称取六味地黄丸1g,按“2.8”项下方法制备供试品溶液,共6份。按“2.2”项下方法测定,以六味地黄丸对照提取液为对照,计算,测得5-羟甲基糠醛质量分数的RSD为1.0%,莫诺苷质量分数的RSD为1.3%,马钱苷质量分数的RSD为1.0%,芍药苷质量分数的RSD为1.1%,丹皮酚质量分数的RSD为1.0%。结果表明,本方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验

精密称取六味地黄丸0.5g,共6份,分别置具塞锥形瓶中,精密加入六味地黄丸对照提取液5mL,加甲醇25mL,超声提取25min,滤过,滤液蒸至近干,转移至10mL量瓶中,加甲醇至刻度,测定,计算回收率。结果5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、芍药苷、丹皮酚平均加样回收率分别为97.1%、95.7%、96.3%、96.8%、95.5%,RSD分别为2.3%、1.3%、1.3%、1.5%、1.0%。结果提示本方法回收率较好,方法可行。

2.11 定量测定

分别采用六味地黄丸对照提取液和混合对照品作为对照物质,对六味地黄丸中5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、芍药苷和丹皮酚5种成分进行定量测定,结果见表2。结果表明,采用两种方法进行定量测定,其结果的相对平均偏差(RD)值均小于1.0%,说明以对照提取液测定法对六味地黄丸进行质量控制在方法上可行。

3 讨论

采用二极管阵列检测器在200~400nm进行扫描,5-羟甲基糠醛、马钱苷、莫诺苷、芍药苷、丹皮酚最大吸收波长分别为284、240、237、233、274nm,在237nm附近均有一定的响应,兼顾5种化合物的紫外吸收,确定本实验检测波长为237nm。

表2 六味地黄丸中5种成分的测定(n=6)

Table 2 Determination of five constituents in LDP (n=6)

对照物质	质量分数 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)				
	5-羟甲基糠醛	莫诺苷	马钱苷	芍药苷	丹皮酚
对照提取液	428.1	680.2	520.7	457.1	892.3
混合对照品	432.6	688.6	527.2	465.3	908.6
RD / %	0.52	0.61	0.62	0.89	0.91

通过对六味地黄丸对照提取液中5-羟甲基糠醛、莫诺苷、马钱苷、芍药苷和丹皮酚进行标定和稳定性研究,结果验证了样品中5种成分的分离度和稳定性符合定量要求。因此,以中成药对照提取液作为对照物质对六味地黄丸进行质量控制在方法上是可行的。

中成药对照提取液测定法和现有的质量控制方法相比,定量测定结果的RD值均小于1.0%。本方法能同时对多成分进行控制,简化检验过程,大大地降低检验成本(由目前每批次上千元的检验成本降低为几十元)。而且对照提取液的制备方法简便,利于推广应用。

如果采用中成药对照提取液测定法进行质量控制,可以在技术上控制企业生产、满足简单检验标准的假药,所以本方法如果能正式成为法定的检验标准,这对于节约检验成本,提升中药的质量控制水平具有重要的现实意义。

本课题组正进行该对照提取物的长期稳定性研究,考察对照药材提取物在不同保存条件下的稳定性,并将多组分控制中成药质量的方法拓展开来,对中成药中共有峰进行研究,加强对未知成分的定量测定研究。

本实验只对六味地黄丸进行了研究,下一步将对六味地黄丸的系列品种及其他较复杂工艺的中成药进行研究,以考察方法的适用性。

参考文献

- [1] 中国药典[S].一部.2010.
- [2] 富同义,顾琳娜.浅谈现行中药质量标准的局限性与构建要素[J].现代中药研究与实践,2006,20(2):5-6.
- [3] 张铁军.中药质量认识与质量评价[J].中草药,2011,42(1):1-9.
- [4] 肖小河,金城,鄢丹,等.中药大质量观及实践[J].中草药,2010,41(4):505-508.